

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/03418

02.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 3月17日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-071760
[ST. 10/C]: [JP2003-071760]

REC'D 22 AUG 2003

WIPO

PCT

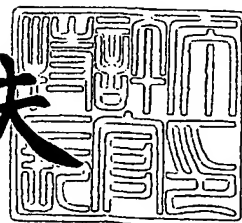
出 願 人
Applicant(s): 早出 広司

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2003-3062720

【書類名】 特許願
【整理番号】 PSD-0018
【提出日】 平成15年 3月17日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N
【発明者】

【住所又は居所】 東京都目黒区南 1 - 1 3 - 1 6

【氏名】 早出 広司

【特許出願人】

【識別番号】 596153357

【氏名又は名称】 早出 広司

【代理人】

【識別番号】 100105991

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 玲子

【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

【識別番号】 100106840

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 耕司

【電話番号】 03-5521-1530

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-196177

【出願日】 平成14年 7月 4日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 112462

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を有する改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 2】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 P Q Q G D H の第 186 残基から第 206 残基の領域または他の種における同等の領域において 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 3】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 P Q Q G D H の 192 番目のグルタミン残基もしくは他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 4】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 5】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている、請求項 4 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 6】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基と 167 番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 7】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 167 番目のアスパラ

ギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている、請求項6記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項8】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている、請求項6記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項9】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項10】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項9記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項11】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている、請求項9記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項12】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項13】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請

求項 12 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 14】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ 452 番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている、請求項 12 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 15】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH の 193 番目のロイシン残基もしくは他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 16】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 193 番目のロイシン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 17】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 193 番目のロイシン残基がアラニン残基またはグリシン残基で置換されている、請求項 16 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 18】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列

Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1 が Gln であるとき Xaa2 は Leu ではない)

を含むことを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 19】 Xaa1 が Ala、Gly、Glu、Leu、Phe、Ser または Asp であり、Xaa2 が Ala または Gly である、請求項 18 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 20】 請求項 1-19 のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

【請求項 21】 請求項 20 に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項 22】 請求項 20 に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項 23】 請求項 20 に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている

、請求項 22 記載の形質転換体。

【請求項 24】 請求項 1-19 のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

【請求項 25】 請求項 1-19 のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素（PQQGDH）の製造、およびグルコースの定量におけるその使用に関する。

【0002】

【従来の技術】

血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーである。また、微生物を用いる発酵生産においては、プロセスをモニタリングするためにグルコース濃度を定量する。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ（GOD）あるいはグルコース 6 リン酸脱水素酵素（G6PDH）を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要があった。G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD（P）を添加しなければならない。

【0003】

そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQGDHの応用が注目されている。PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。

【0004】

PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。例えば、AM. Clet

on-Jansen et al., J. Bacteriol. (1990) 172, 6308-6315を参照されたい。一方、水溶性PQQGDHはAcinetobacter calcoaceticus のいくつかの株においてその存在が確認されており (Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59 (8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている (Mol. Gen. Genet. (1989), 217: 430-436)。A. calcoaceticus由来水溶性PQQGDHは、分子量約50 kDaのホモダイマーである。他のPQQ酵素とは蛋白質の一次構造上でのホモロジーがほとんどない。

【0005】

最近、Acinetobacter calcoaceticus由来の水溶性PQQGDHのX線結晶構造解析の結果が報告され、活性中心をはじめとした本酵素の高次構造が明らかとなった。(A. Oubrie et al., J. Mol. Biol., 289, 319-333(1999); A. Oubrie et al., The EMBO Journal, 18(19) 5187-5194 (1999); A. Oubrie et al. PNAS, 96(21), 11787-11791 (1999))。これらの論文によれば、水溶性PQQGDHは6つのW-モチーフから構成される β プロペラ蛋白質であることが明かとなった。

【0006】

PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。しかしながらPQQGDHはグルコースに対する選択性が低いことが問題であった。

【0007】

本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある。

【特許文献1】

特開2001-346587

【特許文献2】

特開2001-197888

【非特許文献 1】

Mol. Gen. Genet. (1989), 217:430-436

【非特許文献 2】

A. Oubrie, et al. (1999) J. Mol. Bio. , 289, 319-333

【非特許文献 3】

A. Oubrie, et al. (1999) The EMBO Journal, 18(19), 5187-5194

【非特許文献 4】

A. Oubrie, et al. (1999), PNAS 96(21), 11787-11791

【0 0 0 8】

【発明が解決しようとする課題】

したがって本発明は、グルコースに対する選択性が高い改変型水溶性 P Q Q G D H を提供することを目的とする。

【0 0 0 9】

【課題を解決するための手段】

本発明者は水溶性 P Q Q G D H を遺伝子工学的に改良してそのグルコースに対する選択性を高め、臨床検査や食品分析などに応用できる改変型 P Q Q G D H を開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性 P Q Q G D H の特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、グルコースに対する選択性が高い酵素を得ることに成功した。

【0 0 1 0】

すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を有する改変型グルコース脱水素酵素を提供する。本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対して高い選択性を有する。好ましくは本発明の改変型 P Q Q G D H は、グルコースに対する反応性と比べて、ラクトースあるいはマルトースに対する反応性が野生型より低下している。より好ましくは、グルコースに対する反応性を 1 0 0 % とした場合、ラクトース

あるいはマルトースに対する活性が50%以下であり、より好ましくは40%以下であり、さらに好ましくは30%以下である。

【0011】

本発明の1つの態様においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基（すなわち天然に存在するPQQグルコース脱水素酵素中の対応するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基）で置換されている。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。

【0012】

本明細書においてアミノ酸残基の位置または領域に関して用いる場合、「同等の」との用語は、構造上類似するが同一ではない2以上の蛋白質において、あるアミノ酸残基または領域が等価の生物学的または生化学的機能を有することを表す。例えば、*Acinetobacter calcoaceticus* 以外の生物に由来する水溶性PQQGDHにおいて、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から206残基の領域とアミノ酸配列類似性の高い領域が存在し、かつ蛋白質の二次構造から見て該領域がその蛋白質において同じ役割を果たしていると合理的に考えられる場合、該領域は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から206残基の領域と同等の領域」と言われる。さらに、該領域の第7番目のアミノ酸残基は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第192残基と同等の位置のアミノ酸残基」と言われる。

【0013】

好ましくは、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの192番目のグルタミン残基もしくは193番目のロイシン残基、または他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。

【0014】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基は、アラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている。

【0015】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基と 167 番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 192 番目のグルタミン残基は、アラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている。また好ましくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 167 番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ 192 番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている。

【0016】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 167 番目のアスパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ 452 番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されているグルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 167 番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されている。また好ましくは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 167 番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ 452 番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている。

【0017】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている。また好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている。

【0018】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基がアラニン残基またはグリシン残基で置換されている。

【0019】

また別の観点においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、配列：
Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がGlnであるときXaa2はLeuではない)を含む。好ましくはXaa1はAla、Gly、Glu、Leu、Phe、SerまたはAspであり、Xaa2はAlaまたはGlyである。

【0020】

本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサ

ーを提供する。

【0021】

本発明の改変型グルコース脱水素酵素の酵素蛋白質はグルコースに対して高い選択性を示し、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高選択的かつ高感度の測定に応用することができる。

【0022】

【発明の実施の形態】

改変型PQQGDHの構造

【0023】

本発明の好ましい改変型グルコース脱水素酵素においては、Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基またはグリシン残基で置換されているか、または193番目のロイシン残基がアラニン残基またはグリシン残基で置換されている。

【0024】

また別の態様においては、本発明の改変型PQQGDHは、上述の置換に加えて、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で、特に好ましくはグルタミン酸残基で置換されている。また好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、上述の置換に加えて、452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で、特に好ましくはトレオニン残基で置換されている。167番目のアスパラギン酸残基および452番目のアスパラギン残基がPQQGDHによる基質の認識および結合に関与することは、それぞれ特開2001-346587および特開2001-197888に記載されている。しかし、一般的には、異なるドメインに存在するアミノ酸残基に同時に変異を導入することにより、基質の選択性や酵素活性がどのように変化するかについては、全く予測することができない。場合によっては、酵素活性が全く失われることもある。したがって、本発明において、これらの変異を同時に導入することによりグルコースの

選択性の向上が得られたことは、驚くべき発見であった。

【0025】

また別の観点においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、配列：
Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がGlnであるときXaa2はLeuではない)を含む。好ましくはXaa1はAla、Gly、Glu、Leu、Phe、SerまたはAsnであり、Xaa2はAlaまたはGlyである。

【0026】

改変型PQQGDHの製造方法

Acinetobacter calcoaceticus 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、置換すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列を、所望のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が、当該技術分野において知られており、例えば、Sambrookら, "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

【0027】

このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

【0028】

本発明の改変型PQQGDHにおいては、所望のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野においてよく知られている。

【0029】

さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、蛋白質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予測された二次構造を比較することにより、Acinetobacter calcoaceticus由来の水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域と同等の領域を容易に認識することができ、本発明にしたがって、この領域中のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、グルコース選択性の向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。これらの改変型グルコース脱水素酵素も本発明の範囲内である。

【0030】

上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。

【0031】

酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2，6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

【0032】

グルコースに対する選択性

本発明のPQQGDHのグルコースに対する選択性は、基質として、2-デオ

キシードーグルコース、マンノース、アロース、3-オースメチルD-グルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトース等の各種の糖を用いて上述のように酵素活性を測定し、グルコースを基質としたときの活性に対する相対活性を調べることにより評価することができる。

【0033】

本発明の改変型PQQGDHは野生型酵素と比較して、グルコースに対する選択性が向上しており、特にマルトースに対する反応性と比較してグルコースに対する反応性が高い。したがって、本改変型酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーはグルコース測定に関して選択性が高く、種々の糖が存在する試料においても高感度でグルコースが検出できるという利点を有する。

【0034】

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

【0035】

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定

あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型 P Q Q G D H はホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、P Q Q を別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型 P Q Q G D H をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

【0036】

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、P Q Q および CaCl_2 、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型 P Q Q G D H を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えば Ag/AgCl 電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

【0037】

【実施例】

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0038】

実施例 1

改変型酵素 P Q Q G D H 遺伝子の構築

配列番号 2 に示される *Acinetobacter calcoaceticus* 由来 P Q Q G D H の構造遺伝子をもとに、変異の導入を行った。プラスミド p G B 2 は、ベクター p T r c 9 9 A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来 P Q Q G D H をコードする構造遺伝子を挿入したものである（図 1）。常法に従って部位特異的変異法により 192 番目のグルタミン残基または 193 番目のロイシン残基をコードする塩基配列

を、それぞれアラニン残基またはグリシン残基をコードする塩基配列に置換した。さらに、167番目のアスパラギン酸残基または452番目のアスパラギン残基をコードする塩基配列を、それぞれグルタミン酸残基またはグリシン残基をコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を表1に示す。2カ所の変異を有する変異体を作成するためには、2種類のオリゴヌクレオチドターゲットプライマーを同時に用いて上記と同様に変異を導入した。

【表1】

Gln192Ala	5'- ata agc aag cgg gtt acg ccc -3'
Gln192Gly	5'- caa ata agc aag ccc gtt acg ccc ttg -3'
Gln192Leu	5'-caa ata agc aag cag gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Phe	5'-caa ata agc aag aaa gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Ser	5'-caa ata agc aag gct gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Asn	5'-caa ata agc aag gtt gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Asp	5'-caa ata agc aag atc gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Glu	5'-caa ata agc aag ttc gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Lys	5'-caa ata agc aag ttt gtt acg ccc ttg-3'
Leu193Ala	5'- caa ata agc agc ctg gtt acg -3'
Leu193Gly	5'- gaa caa ata agc acc ctg gtt acg ccc -3'
Asp167Glu	5'- cc tga ctg atg ttc ttt tga tga agg -3'
Asn452Thr	5'- c atc ttt ttg gac agt tcc ggc agt at -3'

【0039】

ベクタープラスミドpKF18k（宝酒造（株））にAcinetobacter calcoaceticus 由来PQQGDHをコードする遺伝子の一部を含むKpn I-Hind III断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート50fmolと宝酒造（株）製Mutan（登録商標）-Express Kmキットに付属のセレクションプライマー5pmol、リン酸化したターゲットプライマー50pmolを全体（20 μ l）の1/10量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100℃、3分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1本鎖にした。セレクションプライマーはpKF18kのカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを5分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに3 μ lの同キットエクステンションバッファ

一、 $1\mu\text{l}$ のT4 DNAリガーゼ、 $1\mu\text{l}$ のT4 DNAポリメラーゼおよび $5\mu\text{l}$ の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。これをDNAのミスマッチ修復能欠損株であるE.coli BMH 71-18 mutSに形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

【0040】

次に、ここから抽出したプラスミドをE.coli MV 1184に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミドpGB 2上の野生型PQQGDHをコードする遺伝子のKpn I-Hind III断片と入れ替え、改変型PQQGDHの遺伝子を構築した。

【0041】

実施例 2

改変型酵素の調製

野生型または改変型PQQGDHをコードする遺伝子を、E. coli用の発現ベクターであるpTrc 99A (ファルマシア社)のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドをE.coli DH5 α 株に形質転換した。これを450mlのL培地 (アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、クロラムフェニコール $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有)で坂口フラスコを用いて 37°C で一晩振とう培養し、 1mM CaCl_2 、 $500\mu\text{M}$ PQQを含む7lのL培地に植菌した。培養開始後約3時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度 0.3mM になるように添加し、その後1.5時間培養した。培養液から遠心分離 ($5000\times g$ 、10分、 4°C)で菌体を回収し、この菌体を 0.85% NaCl溶液で2回洗浄した。集菌した菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離 ($10000\times g$ 、15分、 4°C)で未破碎の菌体を除去した。上清を超遠心分離 ($160500\times g$ (40000r.p.m.)、90分、 4°C)し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

【0042】

実施例 3

酵素活性の測定

実施例 2 で得られた野生型および各改変型 P Q Q G D H の粗精製酵素標品をそれぞれ $1 \mu\text{M}$ P Q Q、 1mM CaCl_2 存在下で 1 時間以上ホロ化した。これを $187 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $3 \mu\text{l}$ の活性試薬 (6mM D C I P $48 \mu\text{l}$, 600mM P M S $8 \mu\text{l}$, 10mM リン酸緩衝液 $\text{pH} 7.0$ $16 \mu\text{l}$) および各濃度の D-グルコース溶液 $10 \mu\text{l}$ を加え、酵素活性を測定した。

【0043】

酵素活性の測定は、室温において、 10mM M O P S - N a O H 緩衝液 ($\text{pH} 7.0$) 中において P M S (フェナジンメトサルフェート) - D C I P (2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール) を用い、D C I P の 600nm の吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の D C I P が還元される酵素活性を 1 ユニットとした。また、D C I P の $\text{pH} 7.0$ におけるモル吸光係数は 16.3mM^{-1} とした。

【0044】

基質濃度対酵素活性のプロットから、 K_m を求めた。結果を表 2 に示す。

【表 2】

	グルコースに対する K_m 値(mM)	V_{max} (U/mg)
野生型	30	129
Gln192Ala	50	123
Gln192Gly	36	94
Leu193Gly	177	42
Leu193Gly	157	46

【0045】

実施例 4

基質特異性の評価

各改変型酵素の粗精製酵素標品について基質特異性を調べた。実施例 2 で得られた野生型および各改変型 P Q Q G D H の粗精製酵素標品をそれぞれ $1 \mu\text{M}$ P Q Q、 1mM CaCl_2 存在下で 1 時間以上ホロ化した。これを $187 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $3 \mu\text{l}$ の活性試薬 (6mM D C I P, 600mM P M S, 10mM

リン酸緩衝液 pH 7.0 を含む) および基質を加えた。基質として、それぞれ終濃度 20 mM または 100 mM となるように 400 mM のグルコースまたは他の糖を加え、室温で 30 分間インキュベートして、実施例 3 と同様に酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性を 100% とし、これに対する相対活性で表した。結果を表 3-5 に示す。

【0046】

【表 3】

	野生型	Gln192Ala	Gln192Gly	Leu193Ala	Leu193Gly
基質濃度	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
アロース	45	29	34	50	39
3-O-m-グルコース	82	80	101	66	60
ガラクトース	8	10	12	34	26
マルトース	49	20	24	39	30
ラクトース	53	56	40	64	56
セロビオース	85	138	85	84	71

【0047】

【表 4】

	野生型	Gln192Ala	Gln192Gly	Leu193Ala	Leu193Gly
基質濃度	100mM	100mM	100mM	100mM	100mM
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
アロース	62	41	45	47	35
3-O-m-グルコース	92	93	98	86	59
ガラクトース	8	6	19	25	17
マルトース	51	56	44	50	46
ラクトース	51	56	44	50	46
セロビオース	42	73	59	59	39

【0048】

【表 5】

	野生型		Gln192Leu		Gln192Phe		Gln192Ser		Gln192Asp		Gln192Glu	
	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM
基質濃度	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
グルコース	0	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
2-デオキシグルコース	7	9	0	0	2	31	5	0	0	0	0	0
マンノース	41	65	70	78	31	41	41	26	17	16	16	16
アロース	80	97	84	90	62	89	89	46	50	63	63	63
3-O-m-グルコース	8	6	23	20	61	19	19	1	2	4	4	4
ガラクトース	5	8	17	26	28	7	7	0	0	0	0	0
キシロース	58	59	63	54	105	66	66	57	53	60	60	60
ラクトース	67	55	55	36	31	35	35	8	1	8	8	8
マルトース	85	44	90	55	-	-	-	148	82	-	-	-
セロビオース												

【0049】

また、二重変異を有する本発明の改変型酵素を用いて、酵素活性を測定した結果を表6-7に示す。本発明の改変型酵素はいずれも、マルトースに対する反応性と比較してグルコースに対する高い反応性を示した。

【0050】

【表 6】

	Asp167Glu/A sn452Thr	Gln192Gly/A sn452Thr
基質濃度	20mM	20mM
	100(%)	100(%)
	2	32
	4	98
	2	14
	12	46
	2	21

【0051】

【表 7】

	野生型		Asp167Glu/ Leu192Ala		Asp167Glu/ Leu192Gly		Asp167 Glu/Gln 192Leu		Asp167Glu/ Gln192Ser		Asp167Glu/ Gln192Asn		Asp167 Glu/Gln 192Glu		Asp167 Glu/Gln 192Lys	
	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM
基質濃度	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
グルコース	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	1	8	1	8
2-デオキシ グルコース	7	9	1	0	0	0	0	0	0	0	2	9	3	11	3	11
マンノース	41	65	6	5	6	7	2	1	0	0	16	26	5	63	5	63
アロース	80	97	2	4	6	8	2	0	0	0	9	14	6	35	6	35
3-O-m グルコース	8	6	5	7	1	4	21	3	0	0	10	12	9	70	9	70
ガラクトース	5	8	0	1	0	0	5	0	0	0	3	9	2	9	2	9
キシロース	58	59	58	61	50	43	57	61	43	43	49	44	54	90	54	90
ラクトース	67	55	11	11	1	5	22	6	3	3	42	40	16	49	16	49
マルトース	85	44	-	107	215	130	195	240	131	131	-	61	-	74	-	74
セロビオース																

【0052】

実施例 5

基質濃度依存性

本発明の改変型 P Q Q G D H の活性の基質濃度依存性を調べた。各改変型酵素を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ P Q Q、 1 mM C a C l₂ 存在下で 1 時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび $5\text{ }\mu\text{M}$ P Q Q、 10 mM C a C l₂ 存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例 3 に記載の酵素活性の測定法に準じ、D C I P の 600 nm の吸光度の変化を指標とした。結果を図 3 に示す。本発明の改変型 P Q Q G D H は、野生型と比較して高いグルコース濃度において飽和する。また、いずれもグルコース濃度 200 mM まで基質阻害が見られず、K s i は 200 mM 以上であった。

【0053】

実施例 6

酵素の精製

実施例 2 で得られた野生型および Gln192Asp 粗精製酵素をそれぞれ 10 mM リン酸緩衝液 p H 7. 0 で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラム T S K g e l C M - T O Y O P E A R L 650M (東ソー株式会社) に吸着させた。このカラムを 10 mM リン酸緩衝液 p H 7. 0、 750 ml で洗浄した後、 $0-0.2\text{ M}$ N a C l を含む 10 mM リン酸緩衝液 p H 7. 0 を用い、酵素を溶出させた。流速は 5 ml/min で行った。G D H 活性を有する画分を回収し、 10 mM M O P S - N a O H 緩衝液 (p H 7. 0) で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型 P Q Q G D H 蛋白質を得た。得られた精製酵素標品について、各基質に対する酵素活性を測定した。結果を表 8 に示す。

【0054】

【表 8】

	野生型					Glu192Asp				
	Km (mM)	Vmax (U/mg)	kcat (sec ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ ·sec ⁻¹)		Km (mM)	Vmax (U/mg)	kcat (sec ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ ·sec ⁻¹)	
グルコース	25.0	4610	3860	154(100%)		50.0	475	398	8.0(100%)	
アロース	35.5	2997	2509	71(46%)		57.2	226	189	3.3(42%)	
3-O-m- グルコース	28.7	3596	3011	105(68%)		64.4	310	260	4.0(51%)	
ガラクトース	5.3	277	232	44(29%)		118.9	137	115	1.0(12%)	
ラクトース	18.9	1982	1659	88(57%)		75.0	390	327	4.4(54%)	
マルトース	26.0	2305	1930	74(48%)		95.8	77	64	0.7(8%)	

【0055】

【表 9】

Asp167Glu/Asn452Thr			
	Km (mM)	kcat (sec ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ ·sec ⁻¹)
グルコース	48	1193	25(100%)
アロース	182	73	0.4(2%)
3-O-m-グルコース	198	215	1.1(4%)
ガラクトース	145	89	0.6(2%)
ラクトース	55	167	3(12%)
マルトース	147	65	0.4(2%)
セロビオース	16	226	14(56%)

【0056】

実施例 7

酵素センサーの作製および評価

5ユニットのGln192Ala改変型酵素にカーボンペースト 20 mg を加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約 40 mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を 1% のグルタルアルデヒドを含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 30 分間処理した後、20 mM リジンを含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 20 分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 1 時間以上平衡化させた。電極は 4℃ で保存した。

【0057】

作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変型 PQQGDH を固定化した酵素センサーを用いて、0.1 mM - 5 mM の範囲でグルコースの定量を行うことができた。

【0058】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Sode, Koji

<120> Glucose Dehydrogenase

<130> psg0018

<150> JP 2002-196177

<151> 2002-07-04

<160> 9

<210> 1

<211> 454

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

Asp	Val	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gln	Phe	Ala	Lys	Ala	Lys	Ser	Glu	Asn
1				5						10				15	
Phe	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Leu	Ser	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	His	Ala	Leu
				20					25					30	
Leu	Trp	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	Ile	Trp	Leu	Thr	Glu	Arg	Ala	Thr	Gly
				35				40						45	
Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Pro	Glu	Ser	Gly	Ser	Val	Lys	Thr	Val	Phe
				50				55						60	
Gln	Val	Pro	Glu	Ile	Val	Asn	Asp	Ala	Asp	Gly	Gln	Asn	Gly	Leu	Leu
				65				70						75	80
Gly	Phe	Ala	Phe	His	Pro	Asp	Phe	Lys	Asn	Asn	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ile
				85							90				95
Ser	Gly	Thr	Phe	Lys	Asn	Pro	Lys	Ser	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Pro	Asn
				100							105				110
Gln	Thr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Lys	Ser	Thr	Asp	Thr	Leu
				115										120	125
Glu	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Lys	Asp	His

130	135	140
Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr		
145	150	155
Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn		160
165	170	175
Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr		
180	185	190
His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile		
195	200	205
Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr		
210	215	220
Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys		
225	230	235
Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu		240
245	250	255
Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys		
260	265	270
Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys		
275	280	285
Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val		
290	295	300
Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro		
305	310	315
Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro		320
325	330	335
Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser		
340	345	350
Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu		
355	360	365

Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile
 370 375 380

Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met
 385 390 395 400

Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
 405 410 415

Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
 420 425 430

Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
 435 440 445

Phe Thr Tyr Lys Ala Lys
 450

<210> 2

<211> 1612

<212> DNA

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 2

agctactttt atgcaacaga gcctttcaga aatttagatt ttaatagatt cgttattcat 60
 cataatacaa atcatataga gaactcgtac aaacccttta ttagaggttt aaaaatttctc 120
 ggaaaatttt gacaatttat aagggtggaca catgaataaa catttattgg ctaaaattgc 180
 tttattaagc gctgttcagc tagttacact ctacgacatt gctgatgttc ctctaactcc 240
 atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagttattc tatctaattc 300
 aaataagccg catgctttgt tatggggacc agataatcaa atttggttaa ctgagcgagc 360
 aacaggtaag attctaagag ttaatccaga gtcgggtagt gtaaaaacag tttttcaggt 420
 accagagatt gtcaatgatg ctgatgggca gaatgggtta ttaggttttg cttccatcc 480
 tgattttaaa aataatcctt atatctatat ttcagggtaca tttaaaaatc cgaaatctac 540
 agataaagaa ttaccgaacc aaacgattat tcgtcgttat acctataata aatcaacaga 600
 tacgctcgag aagccagtcg atttattagc aggattacct tcatcaaaag accatcagtc 660
 aggtcgtctt gtcattgggc cagatcaaaa gatttattat acgattgggtg accaagggcg 720

taaccagctt gcttatttgt tcttgccaaa tcaagcacia catacgccaa ctcaacaaga 780
actgaatggt aaagactatc acacctatat gggtaaagta ctacgcitaa atcttgatgg 840
aagtattcca aaggataatc caagttttta cgggggtggt agccatattt atacacttgg 900
acategtaat ccgcaggggt tagcattcac tccaaatggt aaattattgc agtctgaaca 960
aggcccaaac tctgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtggcaatt atggttggcc 1020
gaatgtagca gggtataaag atgatagtg ctatgcttat gcaaattatt cagcagcagc 1080
caataagtca attaaggatt tagctcaaaa tggagtaaaa gtagccgcag gggtcctgt 1140
gacgaaagaa tctgaatgga ctggtaaaaa ctttgtccca ccattaaaaa ctttatatac 1200
cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttgtgga gagatgacct acatttgctg 1260
gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataagggc ggtaaaaaag caattactgg 1320
ttgggaaaat acattattgg ttccatcttt aaaacgtggt gtcattttcc gtattaagtt 1380
agatccaact tatagcacta cttatgatga cgctgtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440
ttatcgtgat gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtctta tatgtattaa ctgatactgc 1500
cggaaatgtc caaaaagatg atggctcagt acaaaatata ttagaaaacc caggatctct 1560
cattaagttc acctataagg ctaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<220>

<222> 4

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 5

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 3

Gly Arg Asn Xaa Xaa Ala Tyr Leu

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 4

ataagcaagc gggttacgc cc 22

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 5

caaataagca agcccgttac gcccttg 27

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 6

caaataagca gcctggttac g 21

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 7

gaacaaataa gcaccctggt tacgccc 27

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 8

cctgactgat gttcttttga tgaagg 26

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 9

catctttttg gacagttccg gcagtat 27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 10

caaataagca agcaggttac gcccttg 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 11

caaataagca agaaagttac gcccttg 27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 12

caaataagca aggctgttac gcccttg 27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 13

caaataagca aggttggttac gcccttg 27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 14

caaataagca agatcggttac gcccttg 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 15

caaataagca agttcgttac gcccttg 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 16

caaataagca agtttggttac gcccttg 27

【図面の簡単な説明】

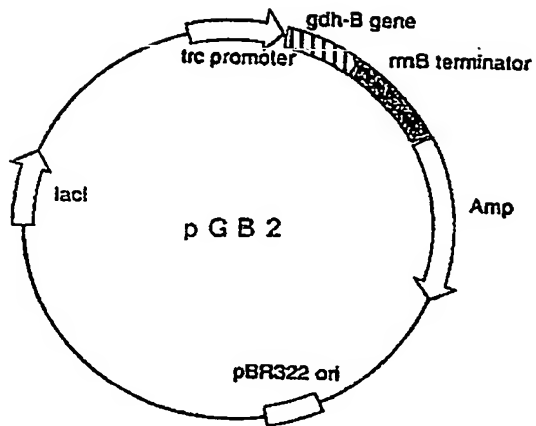
【図1】 図1は、本発明の改変型PQQGDHをコードする突然変異遺伝子を作成するために用いたプラスミドpGB2の構造を示す。

【図2】 図2は、本発明の改変型PQQGDHをコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。

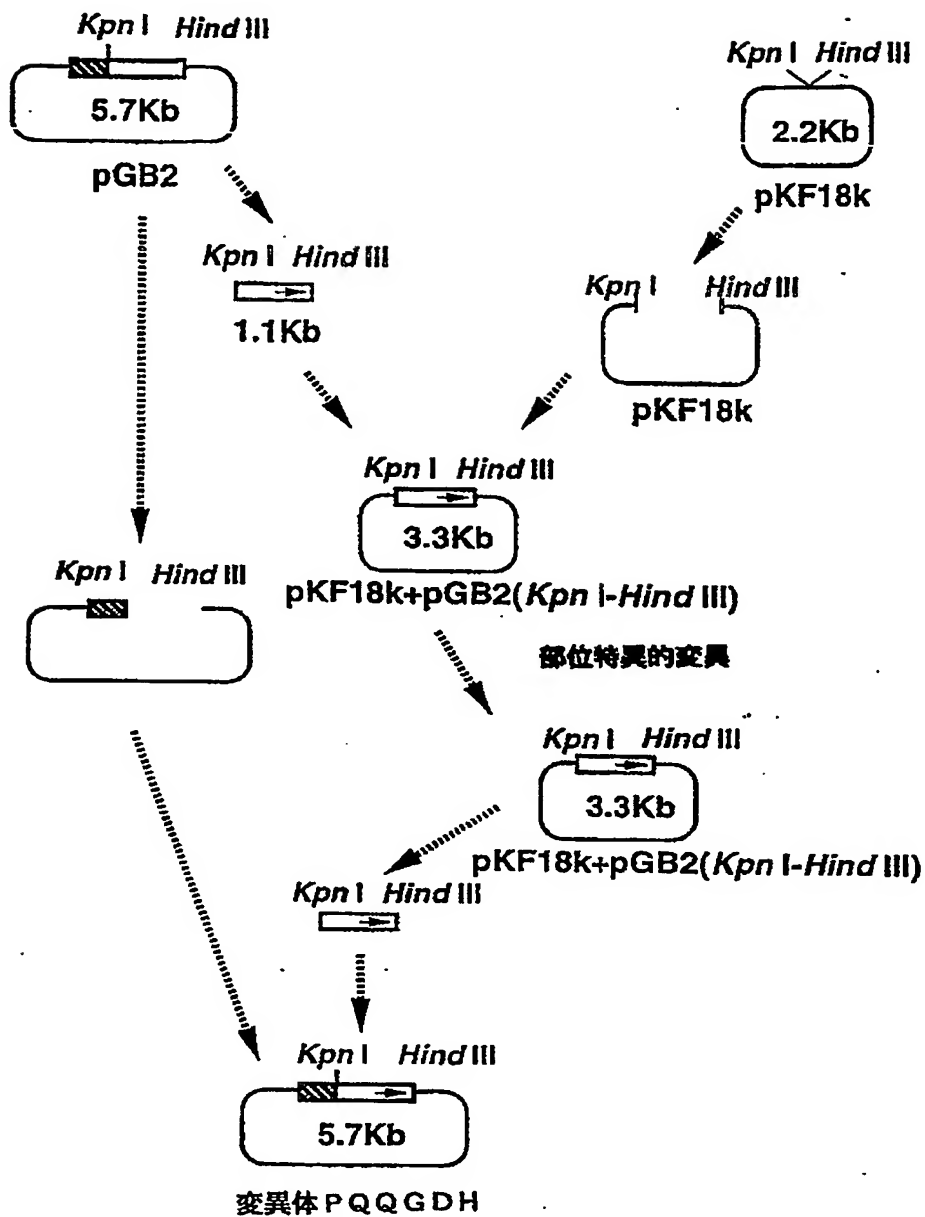
【図3】 図3は、本発明の改変型PQQGDHの活性の基質濃度依存性を示すグラフである。

【書類名】 図面

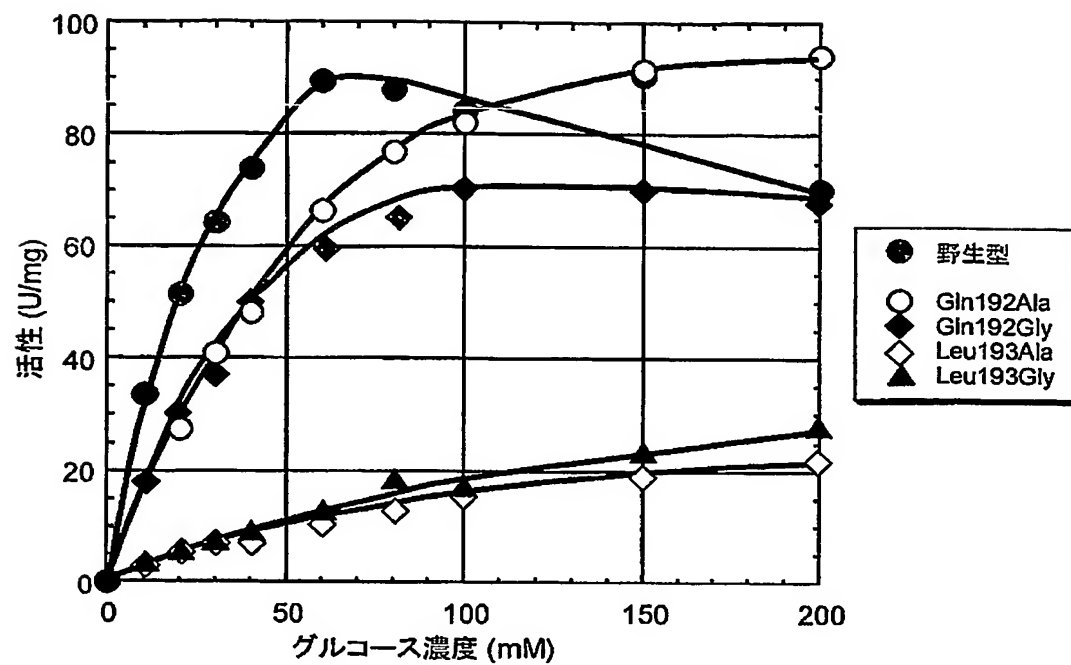
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 グルコースに対する選択性が高い改変型水溶性PQQGDHを提供すること。

【解決手段】 本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素を提供する。本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

【選択図】 なし

特願2003-071760

出願人履歴情報

識別番号

[596153357]

1. 変更年月日

1996年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都目黒区南1-13-16

氏 名

早出 広司